

Chapitre V

Dynamique d'une protéine dénaturée

Nous présentons dans ce chapitre l'étude par diffusion incohérente inélastique des neutrons de la dynamique de la NCS au cours du processus de dénaturation en fonction de la température. Seule la région quasi-élastique des spectres (correspondant à un transfert en énergie inférieur à 1 meV) a été analysée. En effet, la statistique de nos mesures n'était pas suffisante pour exploiter de manière satisfaisante la partie inélastique des spectres.

5.1. MATERIEL ET METHODES

5.1.1. Préparation des échantillons

Pour minimiser le signal du solvant par rapport à celui de la protéine, les échantillons ont été préparés avec une solution tampon deutérée. La purification de la protéine et la préparation en tampon deutéré sont décrits au chapitre II.

Nous avons préparé deux solutions de protéine de concentrations différentes : 58 mg/ml et 42 mg/ml. La première solution a été utilisée pour faire des mesures successivement à 20.8, 61.8 et 71°C. La deuxième (moins concentrée par manque d'échantillon) a été utilisée pour les mesures à 66.8°C. Nous avons utilisé deux solutions différentes afin de minimiser les problèmes d'agrégation qui peuvent survenir quand on maintient la solution de protéine pendant plusieurs heures à une température appartenant à la région de transition.

Il faut remarquer que la plupart des travaux sur la dynamique des protéines par diffusion incohérente des neutrons se sont faits sur des poudres hydratées. Notre choix d'utiliser une protéine en solution plutôt qu'une protéine en poudre hydratée, a été guidé par plusieurs raisons. La première et la plus déterminante est qu'une protéine en solution est dans un environnement biologiquement plus pertinent qu'une protéine en poudre hydratée. La deuxième raison est qu'il est plus simple de relier les résultats dynamiques aux résultats structuraux si ceux-ci sont obtenus sur le même type d'objet. Or les informations structurales ont été obtenues en solution. Finalement, dans une poudre de protéine en conformation dénaturée, il est probable que les macromolécules soient enchevêtrées, ce qui peut avoir des conséquences sur la dynamique. Ce problème disparaît en solution si on travaille à une concentration inférieure à la concentration d'enchevêtrement c_s (dans le cas d'un polymère $c_s = M/NR_g^3$, où M est la masse molaire et N le nombre de monomère)

5.1.2. Diffusion quasi-élastique de neutrons

5.1.2.1. Conditions expérimentales

Les expériences de diffusion quasi-élastique des neutrons ont été faites sur le spectromètre à temps de vol MIBEMOL (voir l'annexe I) du réacteur Orphée au CE de Saclay. La longueur d'onde des neutrons incidents est de 6 Å, ce qui correspond à une énergie

de 2.27 meV. La largeur de la résolution instrumentale FWHM (Full Width at Half Maximum) est de 0.096 meV. L'échantillon est placé dans une cellule plane en Aluminium, d'épaisseur intérieure 1.6 mm, et orientée à 45° par rapport au faisceau incident. En tenant compte de la courbe de dénaturation en fonction de la température, obtenue par diffusion des rayons X, et du temps limité d'expérience qui nous était attribué, nous avons décidé de travailler aux températures suivantes : 20.8°C, 61.8°C, 66.3°C et 71°C. La plus haute température correspond à peu près au point de demi-transition. Les températures ont été réglées à l'aide d'un bain thermostaté.

Nous avons mesuré :

- un spectre de diffusion du vanadium ;
- un spectre de la cuve vide ;
- un spectre de la protéine en solution à chaque température ;
- un spectre du tampon à chaque température.

La durée d'acquisition de chaque spectre de la protéine et du tampon a été d'environ 24 heures.

5.1.2.2. Traitement des données

La grandeur mesurée dans une expérience de temps de vol est le nombre de neutrons $\Delta n(t)$ diffusés pendant le temps T par l'échantillon, détectés dans le canal correspondant au temps de vol t et de largeur Δt , par un détecteur placé à un angle de diffusion θ et couvrant un angle solide $\Delta\Omega$:

$$\Delta n(t) = \Phi_0 T \Delta\Omega \eta A \frac{d^2\sigma(\theta, t)}{d\Omega dt} \Delta t \quad (5.1)$$

- où :
- Φ_0 est le flux de neutrons incidents
 - η l'efficacité du détecteur
 - A un facteur qui tient compte de l'absorption de l'échantillon
 - $\frac{d^2\sigma(\theta, t)}{d\Omega dt}$ la section efficace de diffusion de neutrons en échelle de temps de vol

La mesure de $\Delta n(t)$ donne accès à la section efficace de diffusion en énergie $d^2\sigma(\theta, \omega)/d\Omega dE$, définie au chapitre II, via la relation :

$$\frac{d^2\sigma(\theta, \omega)}{d\Omega dE} = \frac{1}{\hbar} \frac{d^2\sigma(\theta, t)}{d\Omega dt} \left(\frac{dt}{d\omega} \right) \quad (5.2)$$

où $(dt/d\omega)$ peut être obtenue à partir de l'expression qui relie le temps de vol t d'un neutron, son énergie incidente $\hbar\omega_0$, l'énergie $\hbar\omega$ échangée avec l'échantillon, et la distance D séparant l'échantillon du détecteur :

$$t^2 = \frac{m_n D^2}{2\hbar(\omega_0 - \omega)} \quad (5.3)$$

Grâce à une série de détecteurs disposés dans un domaine angulaire large, il est possible de reconstruire numériquement, à partir de $d^2\sigma(\theta, t)/d\Omega dt$, la section efficace de diffusion $d^2\sigma(Q, \omega)/d\Omega dE$, qui est la grandeur qui nous intéresse puisqu'elle est directement reliée au facteur de structure dynamique $S(Q, \omega)$ (voir chapitre I) par :

$$\frac{d^2\sigma(Q, \omega)}{d\Omega dE} = N \frac{\sigma}{4\pi} \frac{k_f}{k_i} S(Q, \omega) \quad (5.4)$$

où N est le nombre de diffuseurs de section efficace de diffusion σ .

Le traitement des données consiste à obtenir le facteur de structure dynamique $S(Q, \omega)$ à partir de la mesure des $\Delta n(t)$. Il comprend différentes étapes :

Normalisation au "moniteur"

Les spectres sont d'abord normalisés au nombre de neutrons vus par l'échantillon pendant la durée T de l'expérience, c'est à dire à la grandeur $\Phi_0 T$, qui est estimée grâce à un moniteur situé immédiatement avant l'échantillon. Par conséquent, tous les spectres sont rapportés au même nombre de neutrons incidents.

Correction d'auto-écranage et soustraction du signal de la cellule vide

Soit une solution S contenue dans une cellule C, qui donne un signal de diffusion D_{S+C} . Il s'agit d'obtenir, à partir de la mesure de D_{S+C} , l'intensité I_S diffusée par la solution seule. Il faut pour cela soustraire le signal mesuré pour la cellule vide D_C , et par ailleurs tenir compte de l'absorption de la solution et de la cellule. On peut démontrer (voir annexe II) que pour une cellule plane, l'ensemble de ces corrections peut se mettre sous la forme :

$$I_S = \frac{D_{S+C} - \gamma_{SC} D_C}{\alpha_S \phi_C} \quad (5.5)$$

où les coefficients γ_{SC} , α_S et ϕ_C dépendent de la géométrie du système, et sont reliés aux sections efficaces de diffusion et d'absorption de l'échantillon et de la cellule. Ils ont été calculés à partir des sections efficaces reportées dans le tableau 1.

Tableau 1

ATOMS	Section efficace de diffusion (10^{-24}cm^2)	Section efficace d'absorption (10^{-24}cm^2)
C	5.551	0.0035
N	11.51	1.9
O	4.232	0.00019
S	1.026	0.53
D	7.64	0.000519
H	82.02	0.3326

Les valeurs ci-dessus ont également été utilisées pour calculer la transmission des échantillons, solutions de protéine et solutions tampon. Les transmissions ainsi obtenues étant comprises entre 0.88 et 0.90, nous avons considéré qu'il n'était pas nécessaire de faire des corrections de diffusion multiple.

Normalisation au vanadium :

Pour s'affranchir de l'efficacité des détecteurs, on normalise par le signal obtenu sur un échantillon de vanadium. Le vanadium est un diffuseur parfaitement incohérent. Son facteur de structure dynamique ne dépend de Q que par le facteur de Debye Waller. En utilisant l'équation (5.1), on montre que la quantité obtenue après normalisation est directement proportionnelle à la grandeur qui nous intéresse $S(Q, \omega)$, puisqu'elle est égale à :

$$\frac{N\sigma}{N_V\sigma_V} S(Q, \omega)$$

où N_V est le nombre d'atomes de vanadium dans le faisceau, et σ_V leur section efficace de diffusion.

Le spectre du vanadium, a un deuxième rôle : il permet de déterminer la fonction de résolution en énergie $R(\omega)$ du spectromètre.

Regroupement

Afin d'améliorer la statistique, les spectres de diffusion ont été sommés sur des groupes de détecteurs, chaque groupe correspondant à des détecteurs situés dans la même région de l'espace. Tous les spectres qui sont dans l'angle mort imposé par la cellule, (entre 40° et 48°) ont été rejetés. Les spectres regroupés sont au nombre de 10. Ce sont sur ces spectres regroupés que l'analyse détaillée dans les paragraphes suivants est conduite.

Soustraction du tampon

Les étapes décrites ci-dessus sont effectuées sur les spectres de solution de protéine et sur les spectres de tampon, et permettent d'obtenir les fonctions de diffusion $S_{\text{solution}}(Q, \omega)$ et $S_{\text{tampon}}(Q, \omega)$, respectivement. Pour obtenir la fonction de diffusion de la protéine $S_{\text{protéine}}(Q, \omega)$, qui seule nous intéresse, il est alors nécessaire de soustraire le signal du tampon. A chaque température on effectue la soustraction suivante :

$$S_{\text{protéine}}(Q, \omega) = S_{\text{solution}}(Q, \omega) - (1-\nu) S_{\text{tampon}}(Q, \omega) \quad (5.6)$$

Le coefficient ν prend en compte le fait que le contenu de solvant libre dans la cellule remplie de solution de protéine est inférieur au contenu de solvant dans la même cellule

remplie de tampon. Il représente la fraction d'eau libre que l'on doit retirer lors de l'introduction de la protéine. Nous l'avons évalué en faisant l'hypothèse qu'il est égal à la somme du volume occupé par la protéine et du volume occupé par la première couche d'hydratation. Ceci revient à faire l'approximation que, dans le domaine de temps de la picoseconde, les molécules d'eau situées au delà de la première couche d'hydratation se comportent comme des molécules d'eau libre. Pour calculer le coefficient v , nous avons utilisé la valeur du volume spécifique $0.736 \text{ cm}^3/\text{g}$ déduite des volumes des acides aminés tabulés par Jacrot (Jacrot 1976). Les valeurs obtenues pour $1-v$ sont alors de 0.93 et de 0.957, pour les échantillons de concentrations 58 mg/ml et 42.8 mg/ml, respectivement.

Il faut finalement remarquer que, pendant la dialyse de la protéine dans le tampon deutéré, certains hydrogènes échangeables qui se trouvent à l'intérieur de la protéine ne sont pas échangés. Au cours de la dénaturation, ces hydrogènes peuvent se trouver en contact avec le solvant deutéré et ainsi être échangés. Ils se trouvent alors libres dans le solvant et vont apporter au signal de diffusion une contribution supplémentaire qui n'appartient plus à la protéine, et qu'il faudrait en toute rigueur soustraire. Toutefois, nous avons calculé que cette contribution est inférieure à 0.7 % du signal du tampon. Il est donc légitime de la négliger.

Nous présentons sur la fig (5.1) un exemple de spectre $S_{\text{solution}}(Q, \omega)$ obtenu sur la solution de protéine, le spectre $S_{\text{tampon}}(Q, \omega)$ du tampon correspondant et le résultat de la soustraction suivant l'expression 5.6.

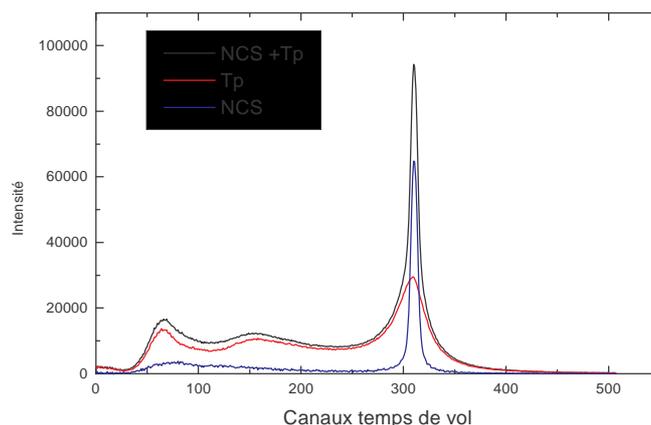


Fig 5. 1 : Courbes de diffusion de la solution de protéine et du tampon seul, à la température de 20.8°C et à $Q = 1.48 \text{ \AA}^{-1}$. Nous avons également représenté la contribution due uniquement à la protéine, déduite des deux contributions précédentes selon l'expression 5.6.

Pour le traitement des données, nous avons utilisé les programmes disponibles au LLB, écrits par R.Khan. Le programme "*soustr*" permet de soustraire la cuve vide et de corriger de l'auto-écrantage. Le programme "*groupe*" permet de soustraire le signal du tampon, et de normaliser par le vanadium. Le programme "*fitmib*" nous a permis de compléter l'analyse des données, décrite dans la suite.

5.1.2.3. Fonction de résolution expérimentale

Théoriquement, la diffusion élastique est décrite par une fonction de Dirac $\delta(\omega)$ dans l'espace des énergies. En réalité, le pic élastique n'est pas infiniment fin, il est décrit par la fonction de résolution de l'appareil, dont la forme et la demi-largeur à mi-hauteur dépendent de la configuration expérimentale. La fonction de résolution prend la forme d'une courbe symétrique en ω , qui, sur Mibemol, est proche d'un triangle. Lors d'une expérience, on mesure la fonction de résolution en faisant l'acquisition d'un spectre élastique de l'échantillon complètement gelé, ou plus couramment du vanadium. La demi-largeur à mi-hauteur de la résolution dépend essentiellement de la longueur d'onde. Dans la configuration instrumentale que nous avons utilisée elle est de $48 \mu\text{eV}$ (longueur d'onde 6 \AA).

Le choix de la résolution utilisée est strictement lié à l'énergie (ou au temps) caractéristique des mouvements qu'on envisage d'analyser. Prenons par exemple le cas de mouvements diffusifs donnant lieu à une diffusion quasi-élastique qui peut être décrite par une Lorentzienne de demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(Q)$. Si $\Gamma(Q)$ est très faible devant la demi-largeur à mi-hauteur de la fonction de résolution, elle n'est pas résolue. Dans ce cas, le signal quasi-élastique est "noyé" dans le signal élastique. Inversement, une lorentzienne trop large se confond avec le bruit de fond et n'est donc pas analysable. On peut traduire ceci en terme de temps, puisque $\Gamma(Q)$ est égale à l'inverse du temps caractéristique τ des mouvements décrits par la lorentzienne : les mouvements beaucoup plus lents que la résolution donnent un signal qui contribue au pic élastique, et les mouvements trop rapides produisent un signal se perdant dans le bruit de fond. Nous reviendrons dans la discussion sur la valeur du rapport entre le plus grand τ accessible et la résolution expérimentale.

5.2. ANALYSE DES SPECTRES DE DIFFUSION QUASI-ELASTIQUE.

5.2.1. Facteur de structure dynamique incohérent dans le cas d'une seule espèce globulaire

5.2.1.1. Diffusion quasi-élastique

Pour simplifier l'interprétation des données, il est indispensable de séparer les différents types de mouvements suivant les échelles de temps sur lesquels ils se produisent, et par conséquent de faire l'hypothèse que ces mouvements ne sont pas couplés. Entre d'autres termes, nous supposons que les mouvements de type vibrationnel, qui apparaissent dans l'échelle de la dizaine de femtosecondes, sont découplés des mouvements de type diffusif, qui ont des temps caractéristiques de l'ordre de la picoseconde. Ceci revient à considérer que le facteur de structure dynamique incohérent, $S_{inc}(Q, \omega)$, est le produit de convolution des facteurs de structure correspondant aux deux types de mouvements, vibrationnel et diffusif :

$$S_{inc}(Q, \omega) = S_{vib,inc}(Q, \omega) \otimes S_{diff,inc}(Q, \omega) \quad (5.7)$$

Dans la région quasi-élastique, qui est celle des mouvements de type diffusif, et qui, pour les échantillons qui nous intéressent, correspond à des transferts d'énergie $|\Delta E| = \hbar\omega < 1$ meV, l'influence de la convolution avec les excitations de vibration se résume essentiellement à un facteur Debye-Waller $DW = \exp(-\langle u^2 \rangle Q^2 / 3)$, et à un bruit de fond supplémentaire indépendant de l'énergie, qui est dû aux mouvements vibrationnels de basse énergie (Bée, 1988). Dans ces conditions, le *facteur de structure dynamique incohérent dans la région quasi-élastique*, que nous cherchons ici à analyser, peut se mettre sous la forme :

$$S_{q.e.,inc}(Q, \omega) = \exp(-\langle u^2 \rangle Q^2 / 3) [S_{diff,inc}(Q, \omega) + B(Q)] \quad (5.8)$$

$S_{diff,inc}(Q, \omega)$ provient des seuls mouvements de type diffusifs et $\langle u^2 \rangle$ représente l'amplitude quadratique moyenne de vibration.

5.2.1.2. Mouvements d'ensemble de la protéine

Dans une poudre de protéine hydratée, les macromolécules sont confinées, ce qui implique que la diffusion quasi-élastique de neutrons a son origine uniquement dans les mouvements internes de la protéine. Il n'en est pas de même dans une solution, où les

protéines peuvent diffuser librement. Ce mouvement de diffusion brownienne influence le spectre de neutrons dans la région quasi-élastique en produisant un élargissement. Il est alors nécessaire, pour obtenir la dynamique interne de la protéine, de déconvoluer le signal mesuré $S_{\text{diff,inc}}(Q,\omega)$ de la fonction de diffusion $S_{\text{ens,inc}}(Q,\omega)$ correspondant aux mouvements d'ensemble de la protéine. Ce découplage est raisonnable dans la mesure où les mouvements browniens des protéines (natives) interviennent dans la gamme de temps 0.05-1 ns, alors que sur un spectromètre en temps de vol nous pouvons détecter les mouvements internes qui ont des temps caractéristiques de l'ordre de quelques picosecondes.

L'équation de base qui gouverne les mouvements de diffusion continue est la loi de Fick :

$$\frac{\delta G_s(r,t)}{\delta t} = D_s \nabla^2 G_s(r,t) \quad (5.9)$$

où $G_s(r,t)$ est la probabilité pour une particule d'être en r à l'instant t , et D_s est le coefficient de diffusion.

Avec les conditions aux limites : $G_s(r,t) = \delta(r)$ à $t=0$, et $G_s(r,t) = 0$ quand $t \rightarrow \infty$, la solution de l'équation précédente est une gaussienne donnée par :

$$G_s(r,t) = \frac{1}{(4\pi D_s t)^{3/2}} \exp(-r^2 / 4D_s t) \quad (5.10)$$

Sa double transformée de Fourier (dans l'espace et le temps) est le facteur de structure dynamique incohérent :

$$S_{\text{inc}}(Q,\omega) = L(Q,\omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(Q)}{\Gamma(Q)^2 + \omega^2} \quad (5.11)$$

Le spectre de neutrons correspondant est une lorentzienne, dont la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(Q)$ croît avec Q suivant la loi : $\Gamma(Q) = D_s Q^2$.

La diffusion de translation globale des protéines dans la solution est régie par les équations précédentes. Le coefficient D_s de self-diffusion suit la loi d'Einstein, $D_s = k_B T / 6\pi R_H \eta$, qui relie D_s au rayon hydrodynamique R_H de la protéine à la température T dans un solvant de viscosité η . Il faut ajouter au mouvement de translation celui de self-rotation, qui, pour une particule dense de forme sphérique, est caractérisé par le coefficient D_r qui suit la loi de Debye-Stokes-Einstein : $D_r = k_B T / 8\pi R_H^3 \eta$. Il a été démontré (Perez J. et al.) que le mouvement de rotation de la particule en solution ne modifie pas le profil lorentzien de la fonction de diffusion, mais augmente seulement sa largeur à mi-hauteur. La

fonction de diffusion $S_{\text{ens,inc}}(Q,\omega)$ correspondant aux mouvements d' ensemble de la protéine est une lorentzienne $L_1(Q,\omega)$ de demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_1(Q) = D_{\text{app}} Q^2$, avec un coefficient de diffusion apparent D_{app} légèrement supérieur à D_s . Pour une protéine de 14 Å de rayon de giration, D_{app} a été trouvé sensiblement égal à 1.27 D_s .

Finalement, le facteur de structure dynamique incohérent correspondant aux mouvements diffusifs peut se mettre sous la forme :

$$S_{\text{diff,inc}}(Q,\omega) = L_1(Q,\omega) \otimes S_{\text{interne}}(Q,\omega) \quad (5.12)$$

où $S_{\text{interne}}(Q,\omega)$ est la fonction de diffusion correspondant aux mouvements internes de la protéine.

5.2.1.3. Mouvements internes de la protéine

Les mouvements diffusifs internes d' une protéine sont caractérisés par un confinement des diffuseurs dans un certain volume. En terme de fonction de diffusion, cela se traduit par la présence d' un pic purement élastique $A(Q)\delta(\omega)$ dans la fonction de diffusion $S_{\text{interne}}(Q,\omega)$, traditionnellement appelé EISF (elastic incoherent structure factor). La variation avec Q de l' intensité de ce pic dépend des *dimensions et de la forme du volume de confinement*. La partie quasi-élastique de $S_{\text{interne}}(Q,\omega)$ dépend des *temps caractéristiques et des amplitudes de diffusion dans le volume de confinement*. Il est évident que l' expression de cette partie quasi-élastique est très compliquée, étant donné la diversité des mouvements diffusifs des atomes d' hydrogène, suivant leur position dans la macromolécule. Dans le but d' obtenir une description phénoménologique simple des mouvements internes, nous avons choisi de décrire la contribution quasi-élastique par une seule Lorentzienne $L_2(Q,\omega)$. Il est clair que ceci constitue une approximation et que $L_2(Q,\omega)$ représente une moyenne des différents types de mouvements diffusifs. Toutefois cette approximation est suffisante pour suivre les modifications de dynamique au cours du dépliement.

Le modèle choisi pour la fonction de diffusion correspondant aux mouvements internes est finalement :

$$S_{\text{interne}}(Q,\omega) = A_0(Q)\delta(\omega) + (1 - A_0(Q))L_2(Q,\omega) \quad (5.13)$$

5.2.1.4. Expression finale du facteur de structure dynamique incohérent

En utilisant les équations (5.8), (5.12) et (5.13), on obtient l' expression suivante pour le signal de diffusion quasi-élastique mesuré expérimentalement sur une solution de protéine :

$$S_{q.e.,inc}(Q, \omega) = \exp\left(-\langle u^2 \rangle Q^2 / 3\right) \left\{ L_1(Q, \omega) \otimes [A_0(Q)\delta(\omega) + (1 - A_0(Q))L_2(Q, \omega)] + B(Q) \right\} \otimes R(\omega) \quad (5.14)$$

où $R(\omega)$ représente la fonction de résolution de l'instrument mesurée sur l' échantillon de vanadium.

Deux remarques s' imposent : la première est que cette expression décrit bien le signal mesuré, à condition de négliger le terme de diffusion cohérente, ce qui est une approximation légitime puisque ce terme est faible devant la contribution incohérente. La seconde est que le signal mesuré ne comporte pas de pic élastique, puisque le terme $A_0(Q)\delta(\omega)$ est convolué à la lorentzienne $L_1(Q, \omega)$ décrivant les mouvements d' ensemble. Il est donc plus raisonnable dans le cas des protéines en solution de ne pas parler d' EISF, mais plutôt de pseudo-EISF $A_0(Q)$, qui est en fait un EISF dans le référentiel de la protéine.

Expérimentalement, le signal de diffusion quasi-élastique incohérent est ajusté à l' expression (5.14), pour chaque valeur du transfert de moment Q indépendamment. On obtient ainsi les quatre paramètres que nous avons introduits ci-dessus, c' est-à-dire :

- le déplacement quadratique moyen de vibration $\langle u^2 \rangle$,
- la demi-largeur $\Gamma_1(Q) = D_{app}Q^2$ de la lorentzienne "étroite" $L_1(Q, \omega)$ qui décrit les mouvements d' ensemble des protéines, et qui permet d' atteindre le coefficient apparent D_{app} de self-diffusion,
- la demi-largeur $\Gamma_2(Q)$ de la lorentzienne "large" $L_2(Q, \omega)$ qui décrit les mouvements internes des protéines, et qui donne accès au temps de corrélation moyen de ces mouvements,
- le pseudo-EISF $A_0(Q)$, dont la variation avec Q donne des informations sur la quantité d' atomes d' hydrogène qui participent à la diffusion, et sur la nature des mouvements.

Cet ajustement ne nécessite pas l' introduction *a priori* d' un modèle, ni pour le pseudo-EISF $A_0(Q)$, ni pour la largeur $\Gamma_2(Q)$ de la lorentzienne $L_2(Q, \omega)$. Ce sont les variations avec Q

de ces deux grandeurs qui permettent de dire, *a posteriori*, si les mouvements internes suivent ou non un modèle théorique donné. Nous décrivons dans le paragraphe suivant les différents modèles de diffusion confinée qui sont les plus aptes à représenter la dynamique interne des protéines, et les expressions de $A_0(Q)$ et de $\Gamma_2(Q)$ qui sont caractéristiques de ces modèles.

5.2.2. Description des différents types de diffusion confinée

Diffusion libre à l'intérieur d'une sphère.

L'EISF correspondant à une particule diffusant librement dans une sphère de rayon a , a été calculé par Volino et Dianoux(1980). Il est égal à :

$$A_0(Q) = \left(\frac{3j_1(Qa)}{Qa} \right)^2 \quad (5.15)$$

où $j_1(x)$ est la fonction de Bessel sphérique de première espèce d'ordre 1. Cette expression est égale à 1 pour $Q=0$ et égale à 0 pour $Q \approx 4/a$. La décroissance de l'EISF avec Q donne accès au rayon de la sphère.

La partie quasi-élastique peut être décrite, en première approximation, par une lorentzienne "moyenne", dont la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(Q)$ a un comportement caractéristique, schématisé sur la figure 5.2. $\Gamma(Q)$ a une valeur finie quand $Q \rightarrow 0$, qui dépend du coefficient de diffusion D de la particule dans la sphère de confinement : $\Gamma(Q) = 4.33D/a^2$. A partir de $Q \approx \pi/a$, $\Gamma(Q)$ commence à croître, pour finalement tendre vers une loi en DQ^2 .

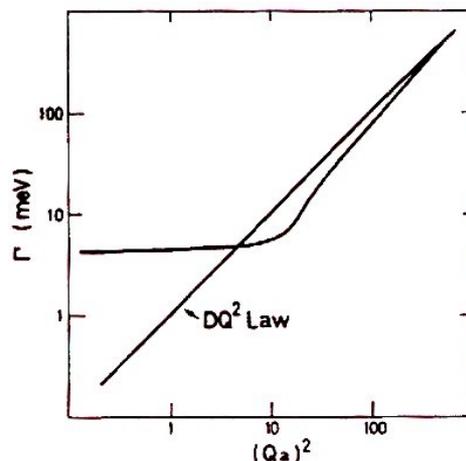


Fig 5. 2 Variation de la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma(Q)$ dans le cas d'une diffusion à l'intérieur d'une sphère de rayon a [Volino & Dianoux 1980].

Ce modèle de diffusion libre dans une chaîne a été utilisé avec succès pour décrire les mouvements des protons des chaînes alkyles dans des mésophases colonnaires (Carpentier 1989). C'est pourquoi nous pensons que ce modèle est pertinent pour décrire les mouvements des hydrogènes appartenant aux chaînes latérales des acides aminés.

Diffusion par sauts entre différents sites

Les atomes d'hydrogène peuvent aussi effectuer des mouvements de sauts entre deux ou trois sites bien définis, leurs déplacements s'effectuant alors sur une sphère. Le comportement avec Q de la largeur $\Gamma(Q)$ donne une signature de ce type de mouvement : $\Gamma(Q)$ est indépendant de Q . Par exemple, les atomes d'hydrogène des groupements méthyles effectuent des sauts de 120° autour d'un axe d'ordre 3. Dans ce cas, la dépendance de $A_0(Q)$ est donnée par la relation :

$$A_0(Q) = \frac{1}{3} \left[1 + 2j_0(Qa\sqrt{3}) \right] \quad (5.16)$$

où $j_0(x) = \sin(x)/x$, et a est le rayon du cercle qui contient les trois sites de réorientation. $A_0(Q)$ présente alors un minimum marqué en $Q \approx 2.6/a$.

On voit sur ces deux exemples, qu'à un type de mouvement correspond un type de comportement de $A_0(Q)$ et de $\Gamma(Q)$. On devrait donc en principe, à partir de l'analyse de $A_0(Q)$ et de $\Gamma(Q)$, être capable de faire la distinction entre différents types de mouvements internes. Ceci est vrai dans les cas simples, et seulement si le domaine en Q exploré est suffisamment grand : en effet, les différentes fonctions $A_0(Q)$ ne diffèrent sensiblement d'une gaussienne que si $Q \geq 2/a$, où a représente la dimension caractéristique du volume de confinement. Dans une protéine, le problème est encore compliqué par le fait que les atomes peuvent adopter une grande variété de mouvements. Les grandeurs mesurées $A_0(Q)$ et $\Gamma(Q)$ sont une "moyenne" sur ces différents mouvements, et leur analyse devient très complexe. Toutefois, il est utile de chercher à décrire les comportements observés pour $A_0(Q)$ et $\Gamma(Q)$ par un modèle donné, même si ce modèle ne reflète pas complètement la réalité, car on peut ainsi faire une comparaison entre la dynamique d'une protéine native et de la même protéine non native.

5.2.3. Description du facteur de structure dynamique incohérent en présence d'espèces non globulaires.

La description donnée au paragraphe 3.1 pour le facteur de structure dynamique incohérent a été introduite pour des objets globulaires compacts, pour lesquels il est aisé de séparer les mouvements d'ensemble (translation et rotation) de la particule, et ses mouvements internes. Il a déjà été montré (Perez 1999) que cette description donne des résultats tout à fait satisfaisants dans le cas d'une protéine native. Il faut par contre modifier notre approche si la protéine est dénaturée.

Une protéine complètement dépliée, comme nous l'avons déjà largement discuté dans le chapitre III, peut être traitée en terme de théorie des polymères, aussi bien pour sa structure que pour la modélisation de sa dynamique. Dans la littérature (pour une revue, voir le chapitre 9 de "Polymers and Neutron Scattering", Higgins et Benoit, 1994), la diffusion quasi-élastique des neutrons dans une solution de polymères est habituellement traitée en terme de fonction de diffusion intermédiaire $S(Q,t)$, que l'on met sous la forme :

$$S(Q,t) = S(Q,0) \exp(-\Gamma(Q)t) \quad (5.17)$$

où $\Gamma(Q)$ peut s'écrire $\Gamma(Q) = DQ^2$. L'expression du coefficient de diffusion D dépend du domaine en Q exploré. Quand $Q \rightarrow 0$, D correspond au *mouvement de diffusion des centres de masse*, c'est-à-dire aux mouvements d'ensemble des polymères. Dans le domaine en Q , $1/R_g < Q < 1/a$, où R_g et a représentent respectivement le rayon de giration et la longueur statistique de la chaîne, D augmente avec Q suivant une loi qui dépend du modèle utilisé. Pour des polymères en solution, le modèle adéquat est celui de Zimm, pour lequel $D \propto Q$. Les mouvements observés dans cette région en Q correspondent aux changements de conformation du squelette, que l'on peut aussi voir comme *fluctuations de position des éléments statistiques*. Quand Q devient supérieur à $1/a$, les mouvements que l'on explore sont les *fluctuations locales* qui se produisent à l'échelle d'un monomère. Il n'existe plus dans cette région en Q de modèle analytique ; seules des discussions qualitatives (Akcasu 1980) suggèrent que D devient à nouveau constant quand Q varie, sa valeur dépendant de la valeur de l'élément statistique a (Figure 5.3). Il faut bien voir qu'en fait les trois types de mouvements cités ci-dessus se superposent et que le coefficient D défini par $D = \Gamma(Q)/Q^2$ représente en fait la "résultante" de ces trois mouvements.

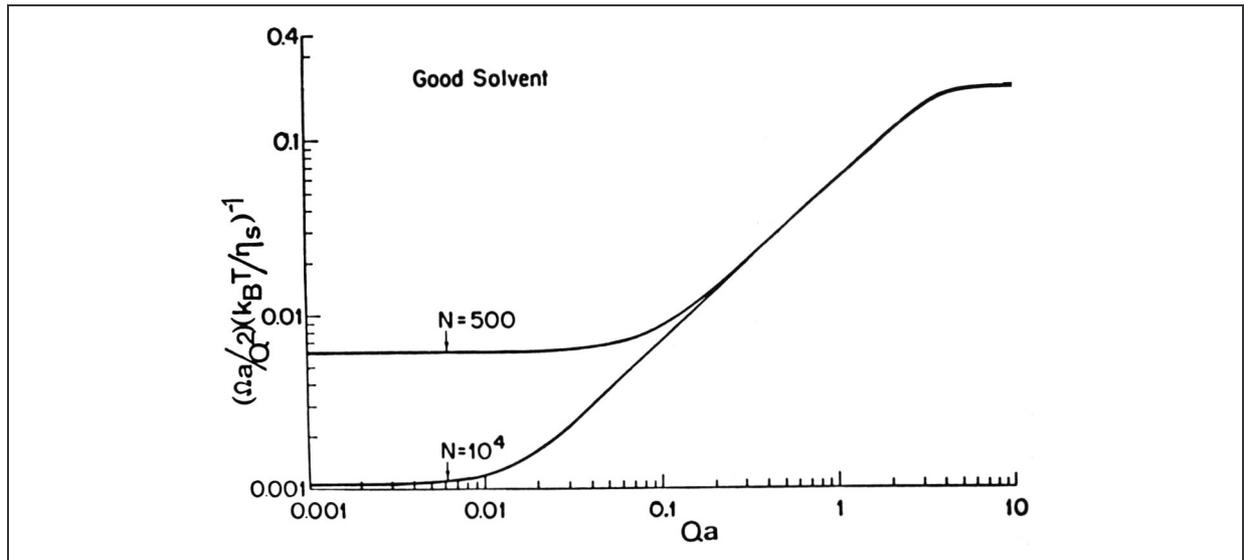


Fig 5. 3 Variation de D en fonction de Qa , en bon solvant, pour deux polymères de poids moléculaire différents. (Akasu 1980)

Le domaine en Q que nous explorons dans nos expériences de diffusion quasi-élastique incohérente des neutrons correspond justement à ce domaine $Q > 1/a$. Toutefois la description précédente (équation 5.17) n'est pas très satisfaisante si l'on veut accéder aux seules fluctuations locales des chaînes latérales des acides aminés de la protéine dépliée. Pour y accéder, il faut faire l'hypothèse qu'il est possible de découpler les trois types de mouvements et que la fonction de diffusion peut se mettre sous la forme :

$$S_{diff,inc}(Q, \omega) = [A_0(Q)\delta(\omega) + (1 - A_0(Q))L_2(Q, \omega)] \otimes L_{cdm}(Q, \omega) \otimes L_{es}(Q, \omega) \quad (5.18)$$

Le premier terme représente les mouvements internes. $L_{cdm}(Q, \omega)$ et $L_{es}(Q, \omega)$ sont deux lorentziennes associées respectivement aux mouvements du centre de masse (c.d.m.) et des éléments statistiques. Le mouvement de diffusion des éléments statistiques est plus rapide que celui du c.d.m., et cela se traduit par un coefficient de diffusion $D_{es} \gg D_{cdm}$. Le produit de convolution des lorentziennes $L_{cdm}(Q, \omega)$ et $L_{es}(Q, \omega)$ est une lorentzienne $L_1(Q, \omega)$, avec une demi-largeur $\Gamma_1(Q) = (D_{es} + D_{cdm})Q^2$.

On voit donc que, moyennant l' hypothèse précédente d' absence de couplage entre les différents mouvements, on retrouve une expression analogue à celle qui prévaut pour les protéines natives. Toutefois, la lorentzienne $L_1(Q,\omega)$ n' est plus nécessairement "étroite" et sa largeur peut ne plus être très inférieure à celle de la lorentzienne $L_2(Q,\omega)$, comme c' est le cas pour les protéines natives. L' ajustement des données suivant une expression du type (5.18) n' est alors possible que si l' on dispose d' une excellente statistique.

En résumé, l' étude de la dynamique de la protéine complètement dénaturée par diffusion quasi-élastique nécessite l' utilisation d' un spectromètre à haut flux. De plus, une analyse simple des données requiert de faire une hypothèse "lourde" (équation 5.18), qui est celle du découplage des différents mouvements mis en jeu dans la chaîne dépliée. Ceci explique que nous n' ayons pas mené une telle étude au cours de ce travail. Nous avons choisi de nous concentrer sur les modifications de la dynamique quand la protéine commence à se déplier. La température la plus élevée atteinte au cours de ce travail (71°C) est voisine du point de demi-transition. On a vu dans le chapitre précédent que, dans ces conditions, la protéine est à parts égales dans une conformation native et dans une conformation intermédiaire, et que l' état complètement déplié n' est pas peuplé. Si l' on admet que dans l' état intermédiaire, il subsiste suffisamment d' interactions entre résidus pour que les mouvements du squelette soient contraints, le facteur de structure dynamique incohérent $S_{diff,inc}(Q,\omega)$ peut se mettre sous la forme :

$$S_{diff,inc}(Q,\omega) = f_N * L_1^N(Q,\omega) \otimes [A_0^N(Q)\delta(\omega) + (1 - A_0^N(Q))L_2^N(Q,\omega)] + f_I * L_1^I(Q,\omega) \otimes [A_0^I(Q)\delta(\omega) + (1 - A_0^I(Q))L_2^I(Q,\omega)] \quad (5.19)$$

Les indices N et I se réfèrent aux états natif et intermédiaire respectivement. Contrairement au cas de la protéine complètement dépliée, $L_1^I(Q,\omega)$ est une lorentzienne "étroite" correspondant, comme pour la protéine native, au mouvement de diffusion d' ensemble.

Il est bien évident que la qualité des données n' est pas suffisante pour ajuster les signaux mesurés à l' aide de l' expression ci-dessus. Mais il est possible de les ajuster à l' aide de l' expression (5.14). Tous les paramètres obtenus au cours de l' ajustement (coefficient de

diffusion apparent, déplacement quadratique moyen, pseudo-EISF, temps de corrélation moyen) représentent alors une moyenne sur les deux populations en présence.

5.3 RESULTATS

La figure (5.4) montre deux exemples d'ajustement des spectres de diffusion de la NCS à l'équation. 5.14, pour une même valeur de Q mais à deux températures différentes. La lorentzienne 'étroite' représente les mouvements d'ensemble de la protéine dans la solution, la lorentzienne 'large' décrit les mouvements diffusifs internes.

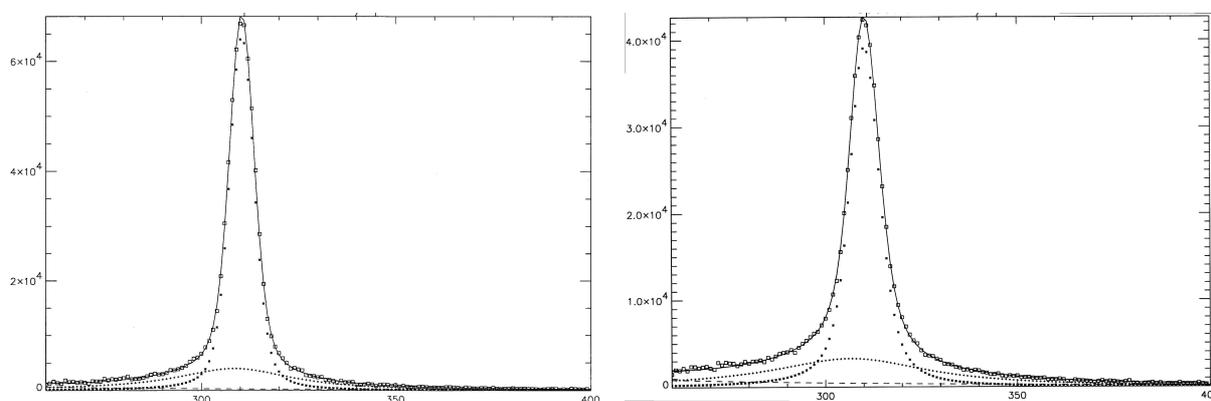


Fig 5.4 : Courbes de diffusion de la NCS corrigées de la contribution due au solvant, à 20.8°C (à gauche) et 61.8°C (à droite), pour une valeur de $Q = 1.48 \text{ \AA}^{-1}$.

5.3.1. Diffusion Brownienne

A partir de l'analyse de la lorentzienne $I(Q, \omega)$, nous avons estimé le coefficient de diffusion D_{app} de la protéine en solution. Pour chaque valeur de la température, la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_1(Q)$ de cette lorentzienne présente une dépendance linéaire en Q^2 (Figure 5.5), ce qui est en accord avec le modèle de diffusion présenté dans la section 3.1.2. La pente de la droite est le coefficient de diffusion apparent D_{app} .

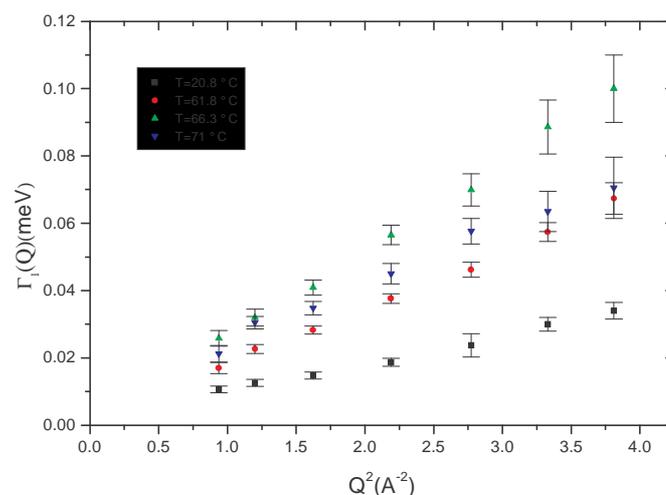


Fig 5.5 Variation de la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_1(Q)$ en Q^2

Nous obtenons les valeurs suivantes : à $T=20.8^\circ\text{C}$, $D_{\text{app}} = (13.54 \pm 0.7)10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($8.97 \pm 0.4 \text{ meV } \text{\AA}^2$); à $T=61.8^\circ\text{C}$, $D_{\text{app}} = (26.21 \pm 1.3) 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($17.36 \pm 0.2 \text{ meV } \text{\AA}^2$); à $T=66.3^\circ\text{C}$, $D_{\text{app}} = (38.8 \pm 1.9) 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($25.7 \pm 0.4 \text{ meV } \text{\AA}^2$); et à $T=71^\circ\text{C}$, $D_{\text{app}} = (32.16 \pm 1.6) 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($21.3 \pm 0.7 \text{ meV } \text{\AA}^2$). La figure 5.4 regroupe ces différentes valeurs.

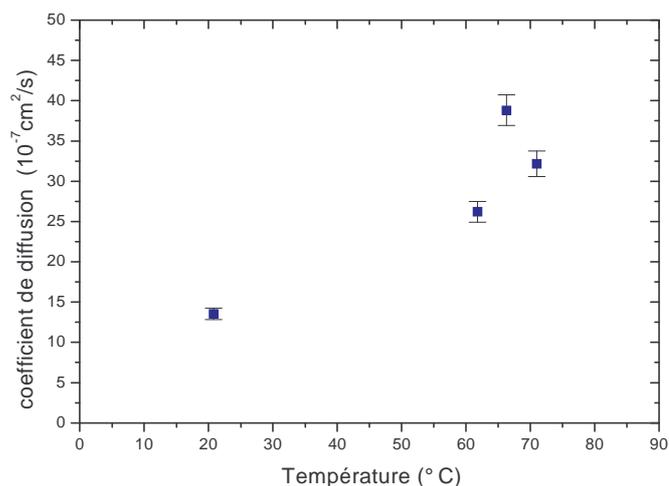


Fig 5.6 Variation des coefficients de diffusion apparents en fonction de la température.

La figure 5.6 montre une évolution croissante de D_{app} jusqu' à la température de 66.3°C, et une diminution brusque ensuite, qui correspond au moment où la protéine commence à se déplier. Pour tenter de comprendre ce comportement de D_{app} , nous avons d' une part estimé un coefficient de diffusion apparent à partir des mesures de rayon de giration faites par rayons X, et d' autre part mesuré par diffusion de la lumière le coefficient de diffusion de translation.

Nous commençons par détailler la façon dont nous avons estimé la valeur de D_{app} à partir des valeurs de R_g . En présence de plusieurs espèces, le coefficient "moyen" de diffusion de translation peut se mettre sous la forme $D = \sum f_i D_i$, où f_i est la fraction de population de l' espèce i . Ceci provient du fait qu' une somme de fonctions $S_i(Q,t)$ avec $S_i(Q,t) = \exp(-D_i Q^2 t)$ peut être approximativement représentée par la fonction $\exp(-(\sum f_i D_i) Q^2 t)$ dans la limite Q tendant vers zéro. Le coefficient de diffusion de translation de l' espèce i est donné par la relation d' Einstein : $D_i = k_B T / 6\pi R_{Hi} \eta$. Nous avons ainsi calculé un coefficient "moyen" de diffusion de translation à partir de l' expression :

$$D_{s,calc}(T) = f_N D_N + f_I D_I + f_D D_D = \frac{k_B T}{6\pi \eta(T)} \left(\frac{f_N}{R_{HN}} + \frac{f_I}{R_{HI}} + \frac{f_D}{R_{HD}} \right)$$

Nous avons utilisé les valeurs des fractions f_N , f_I et f_D obtenues dans l' analyse par SVD. Par ailleurs, nous avons considéré que pour la protéine native $R_H/R_g = 1.3$, que pour la protéine complètement dépliée $R_H/R_g = 0.8$ (Oono, 1983), et que pour la protéine dans l' état intermédiaire, le coefficient de proportionnalité entre R_H et R_g est intermédiaire entre 0.8 et 1.3. Nous avons également pris pour les rayons de giration R_{gN} , R_{gI} et R_{gD} les valeurs trouvées par SVD. Finalement, un coefficient de diffusion d' ensemble $D_{app,calc}$ (translation et rotation) a pu être obtenu par la relation : $D_{app,calc} = 1.27 * D_{s,calc}$, et comparé aux résultats de diffusion quasi-élastique de neutrons (Figure 5.7). Il est très clair que l' estimation ci-dessus a nécessité un grand nombre d' approximations. En particulier, la relation entre le coefficient de diffusion total et le coefficient de diffusion de translation $D_{app} = 1.27 * D_s$ n' est certainement plus tout à fait exacte pour une protéine dépliée. De plus, les effets de concentration ont été négligés, on sait toutefois qu' ils sont faibles (Pérez 1999). Cependant cette estimation permet de vérifier si le coefficient de diffusion D_{app} obtenu à partir de la largeur de la lorentzienne "étroite" a le bon ordre de grandeur. La figure 5.7 montre qu' il en est bien ainsi.

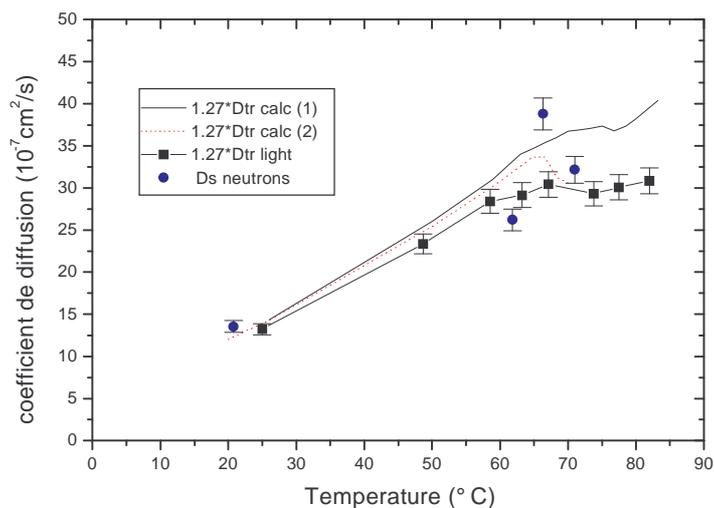


Fig 5. 7 Variation en fonction de la température des coefficients de diffusion calculés : (1) avec le coeff. 0.8 ; (2) avec le coefficient 1.3 ; et expérimentaux : extraits des mesures de neutrons et de diffusion de la lumière.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré le coefficient de diffusion de translation, D_{tr} , par diffusion de la lumière, entre 25°C et 82°C, dans des conditions expérimentales équivalentes à celles décrites dans le chapitre II. La NCS était concentrée à 4mg/ml, dans un tampon phosphate H_2O à pH 7. Pour pouvoir confronter les résultats avec ceux de l'expérience de temps de vol, faite dans D_2O , nous avons normalisé les valeurs des coefficients de diffusion par le rapport entre la viscosité en D_2O et celle en H_2O , aux différentes températures. Là encore, les effets de concentration ont été considérés comme négligeables. Les coefficients D_{tr} , corrigés par le facteur 1.27, sont montrés sur la figure 5.7. Ils sont en bon accord avec les valeurs de D_{app} obtenues par diffusion quasi-élastique de neutrons.

A partir de ces résultats, on peut penser que nous avons procédé de façon correcte pour séparer les mouvements internes des mouvements d' ensemble, et que jusqu'à la température de demi-transition, les mouvements lents dominants sont ceux de self-diffusion dans le solvant (translation et rotation d' ensemble).

Le fait que le coefficient D_{app} extrait des mesures de neutrons soit en accord avec les résultats de diffusion de la lumière, et avec le coefficient de diffusion calculé à partir des rayons de giration, nous permet également de conclure sur le problème d' une éventuelle formation d' agrégats au cours des expériences de neutrons. On peut en effet se poser la question si la concentration en protéine élevée, ainsi que la longue durée des expériences, ne sont pas favorables à la formation d' agrégats. Les valeurs trouvées pour D_{app} entraînent à

penser que si des agrégats existent, ils sont en faible proportion. On peut, de toutes façons supposer que ces agrégats, même s'ils affectent légèrement les mouvements d'ensemble, n'entraînent pas de changements notables dans la dynamique interne, que nous allons maintenant décrire.

5.3.2. Le pseudo-EISF

La variation en fonction de Q du pseudo-EISF $A_0(Q)$ est représentée sur la figure 5.8, pour les quatre températures étudiées. On observe que la décroissance de $A_0(Q)$ avec Q est d'autant plus marquée que la température augmente, ce qui suggère un changement avec la température de la dynamique interne de la protéine.

Pour analyser de façon quantitative ce changement de dynamique interne, il est maintenant nécessaire d'avoir recours à une modélisation. En premier lieu, il faut prendre en compte le fait que les mouvements internes d'une protéine s'étalent sur une grande plage de temps, et que certains de ces mouvements sont hors de la "fenêtre" de l'appareil. Nous ne détectons pas, au cours de notre expérience, les atomes d'hydrogène qui sont seulement soumis à des mouvements plus rapides que quelques picosecondes (mouvements vibrationnels par exemple), et ceux qui ont des mouvements diffusifs plus lents que la résolution instrumentale. La présence de ces hydrogènes dits "immobiles" produit une contribution constante dans le pseudo-EISF $A_0(Q)$. Si p représente leur fraction, on peut mettre $A_0(Q)$ sous la forme :

$$A_0(Q) = p + (1-p)A'_0(Q) \quad (5.20)$$

où $A'_0(Q)$ représente le pseudo-EISF des hydrogènes non-"immobiles". C'est cette quantité que nous allons chercher à analyser par l'un ou l'autre des modèles présentés dans la section 3.2.

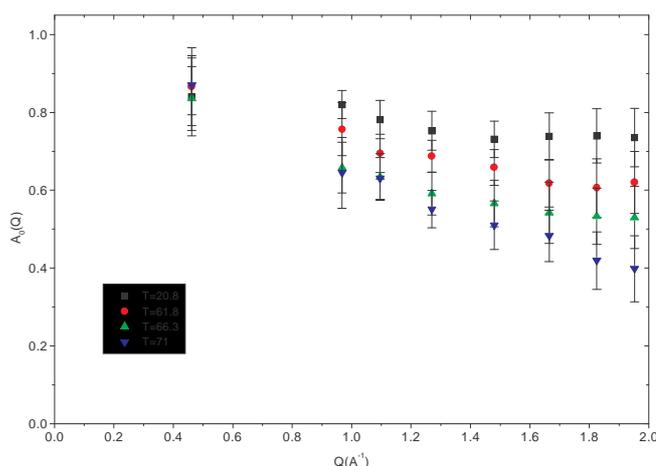


Fig 5. 8 Variation du pseudo-EISF en fonction de Q au cours de la dénaturation.

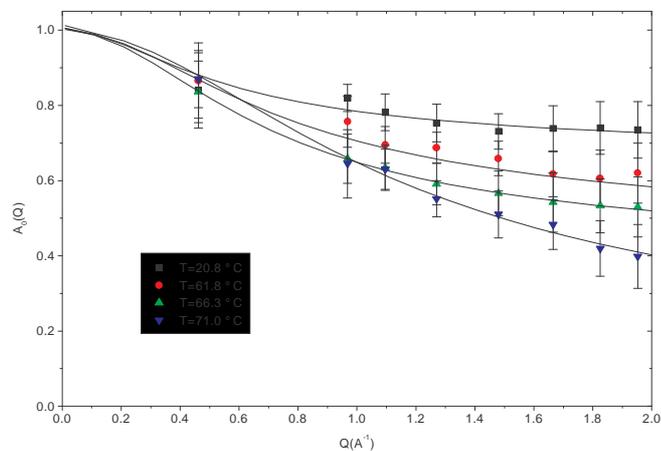
Diffusion confinée dans un sphère.

Afin de prendre en compte l'hétérogénéité des mouvements des protons dans la protéine, nous avons introduit dans le modèle de Volino et Dianoux, décrit précédemment, une distribution $f(a)$ de la longueur caractéristique a (rayon de la sphère), au lieu de prendre une valeur unique. La distribution, $f(a)$, des rayons a des sphères, a été prise de forme gaussienne, $f(a) = \sigma^{-1} (2\pi)^{-0.5} \exp(-(a-c)^2/2\sigma^2)$, où c est le centre de la distribution et σ l'écart type. La valeur moyenne du rayon \bar{a} est égale à $\sigma(2/\pi)^{0.5}$. Le pseudo-EISF $A_0(Q)$ est ajusté en utilisant les expressions 5.15 et 5.20, et la distribution ci-dessus. Les paramètres de l'ajustement sont $c\sigma$ et la proportion p de protons "immobiles". On impose à c d'être positif.

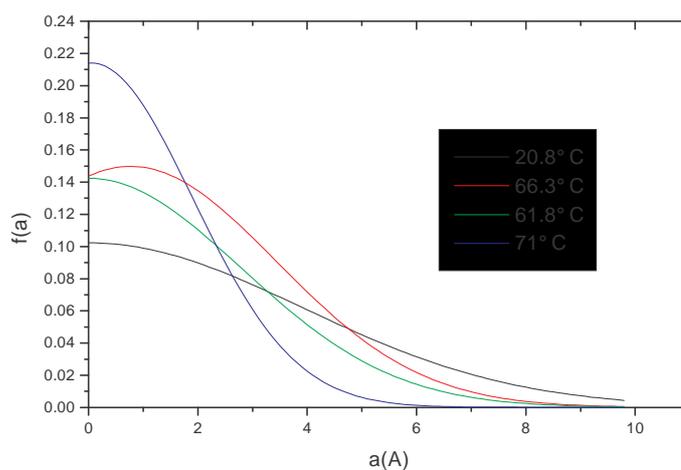
La figure 5.9 montre le résultat des ajustements de $A_0(Q)$, et la distribution $f(a)$ des rayons pour les diverses températures.

On remarque que la valeur c du centre des distributions tend toujours vers zéro, ce qui indique qu'une partie non négligeable des mouvements qui sont détectés ont une petite amplitude. Toutefois, les distributions $f(a)$ présentent toujours une largeur suffisamment grande ($\sigma \geq 1.9$), si on la compare par exemple aux distances caractéristiques des mouvements des hydrogènes appartenant à des chaînes aliphatiques. Rappelons que Carpentier et al. ont trouvé par exemple dans le tétrapalmitate cuivreux que, lorsqu'on progresse le long de la chaîne aliphatique et que l'on s'éloigne du cœur de la molécule, le rayon de la sphère de diffusion des hydrogènes augmente linéairement, adoptant par exemple une valeur l'ordre de

2Å pour le troisième carbone. On peut donc affirmer que de tels mouvements sont bien pris en compte dans les distributions que nous avons déterminé.



A



B

Fig 5. 9 **A.** Ajustement du pseudo-EISF de la NCS en fonction de la température, avec le modèle de diffusion confinée dans une sphère. **B.** Distribution gaussienne des rayons des sphères de diffusion en fonction de la température.

La figure 5.10 montre la variation des paramètres σ et p issus des ajustements, en fonction de la température.

Les deux paramètres σ et p présentent une diminution de 30% entre 20.8°C et 61.8°C, quand la protéine reste de conformation globulaire. Ils montrent ensuite une décroissance brutale, quand la protéine commence à se déplier.

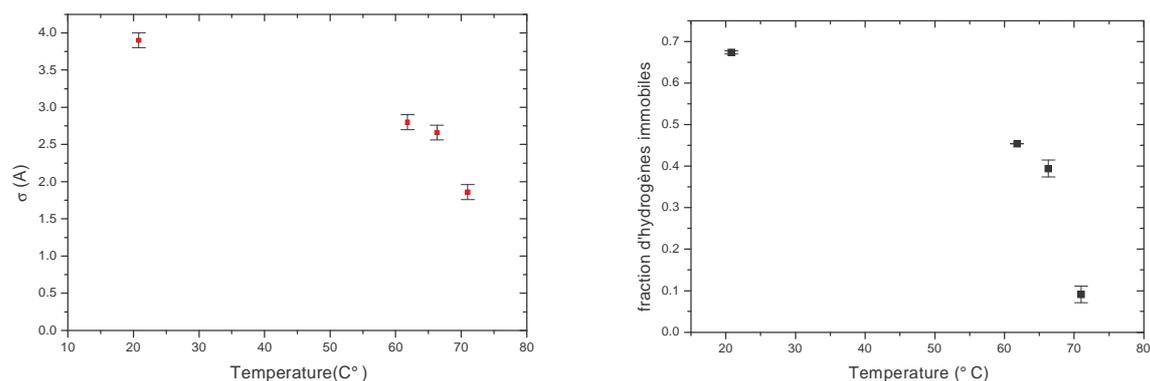


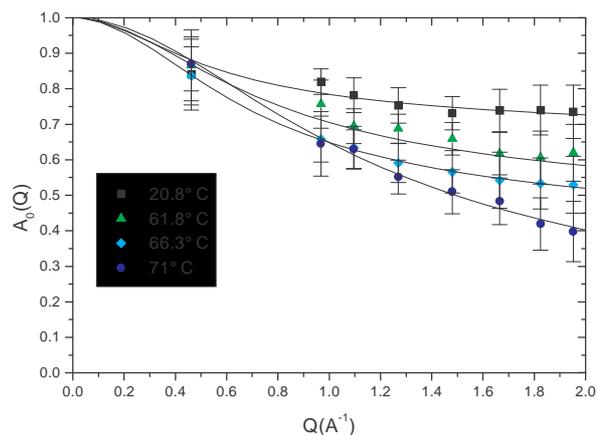
Fig 5. 10 Variation des paramètres σ et p en fonction de la température, dans le cas de la diffusion dans une sphère.

Nous tentons ici une première explication de ce comportement. Une discussion plus approfondie sera exposée dans la section suivante. A température ambiante, la contribution dominante aux mouvements internes peut être attribuée aux chaînes latérales exposées au solvant, qui sont libres dans leurs mouvements, et susceptibles d'explorer un grand espace. Quand on s'approche de la transition de dénaturation ($T=62.8^\circ\text{C}$), des hydrogènes appartenant à des chaînes latérales enfouies dans la matrice protéique se mettent en mouvement. Ceci entraîne une diminution de la proportion p d'hydrogène "immobiles". La diminution simultanée du rayon moyen \bar{a} de la sphère peut se comprendre si l'on considère que ces hydrogènes enfouis ne peuvent pas explorer un espace aussi grand que les hydrogènes exposés.

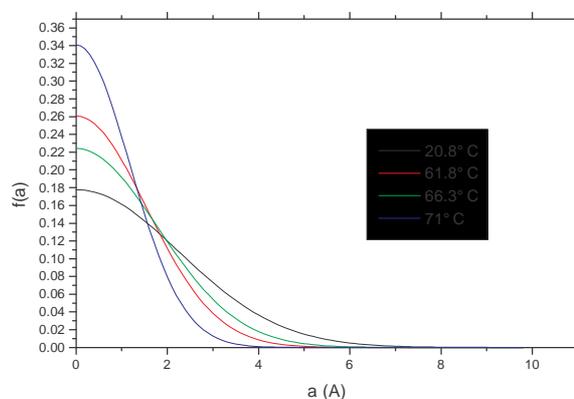
Ce phénomène se renforce encore quand la protéine commence à se déplier. La forte diminution de p , jusqu'à la valeur de 0.09, peut être interprétée par le fait que la presque totalité des hydrogènes soient devenus mobiles à la température de demi-transition.

Sauts entre trois sites

La diffusion sur trois sites décrit les mouvements de réorientation des hydrogènes entre trois positions situées sur un cercle de rayon a . Comme précédemment, nous avons introduit une fonction de distribution gaussienne $f(a)$ pour le rayon a . La figure 5.11 montre le résultat des ajustements du pseudo-EISF $A_0(Q)$ aux équations 5.16 et 5.20, et les distributions $f(a)$ associées, pour chaque température étudiée.



A



B

Fig 5. 11 Ajustement du pseudo-EISF de la NCS en fonction de la température , avec le modèle de diffusion sur trois sites. **B.** Distribution gaussienne des rayon des cercles de diffusion en fonction de la température.

La qualité des ajustements n' est pas différente de celle obtenue dans le cas du modèle de diffusion dans une sphère. On observe aussi que les centres c des différentes distributions tendent vers zéro.

Sur la figure 5.12, nous présentons la variation en fonction de la température des deux paramètres σ et p issus des ajustements.

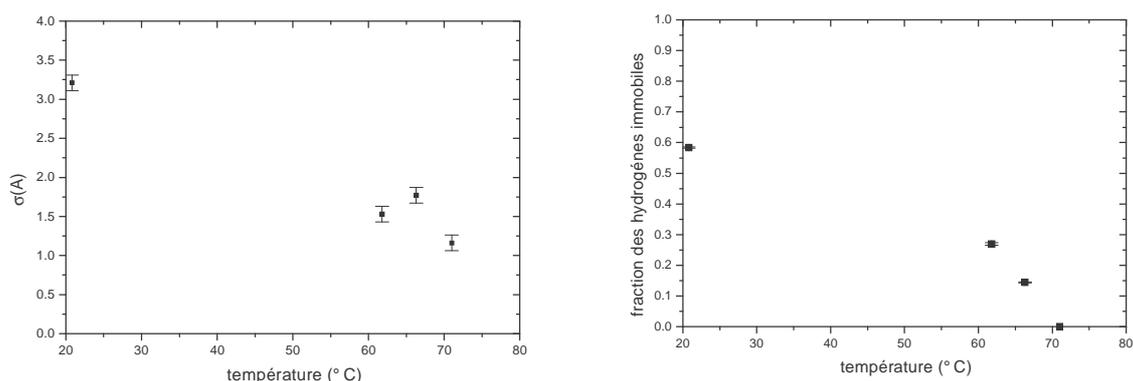


Fig 5. 12 Variation des paramètres σ et p en fonction de la température, dans le cas de la diffusion sur trois sites

Comparaison des deux modèles

D' un point de vue qualitatif, le comportement en température de σ et p dans le cas du modèle de sauts entre trois sites est analogue à celui obtenu avec le modèle de diffusion dans une sphère, si l' on met à part la légère remontée de σ à 66.3 °C. Par contre, les valeurs de σ et p sont systématiquement plus faibles dans le cas du modèle de sauts sur trois sites. Ceci n' est pas très surprenant en ce qui concerne σ , puisque le rayon a n' a pas la même signification dans les deux modèles.

En fait, aucun des deux modèles de diffusion ne donnent une description exacte des mouvements présents dans la protéine. Il est même évident que le modèle de diffusion sur trois sites ne représente que les réorientations des hydrogènes des méthyles, et donc qu' une petite partie des mouvements mis en jeu, en particulier à haute température, quand on s' attend à ce que les chaînes latérales des acides aminés se mettent toutes en mouvement. Il serait plus raisonnable de chercher à appliquer une combinaison des deux modèles, si l' on veut décrire de façon plus complète la dynamique interne. Toutefois, l' absence d' informations sur la manière de pondérer la combinaison des deux modèles, ainsi que la statistique insuffisante des données expérimentales, nous interdit de faire ce type de démarche.

Finalement, le point important à dégager de cette analyse est que les deux principaux modèles, qui décrivent chacun une partie des mouvements de la protéine, conduisent au même type de variation en température des paramètres caractéristiques de ces mouvements. En résumé, *l'intérêt des expériences de diffusion quasi-élastique des neutrons réside, non pas dans la détermination exacte des paramètres caractéristiques des mouvements mis en jeu,*

mais dans la détermination de leur évolution en fonction de la température au cours de la transition de dénaturation.

5.3.3 Largeur quasi-élastique

La demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_2(Q)$ est représentée en fonction de Q sur la figure 5.13, pour les différentes températures. On observe que $\Gamma_2(Q)$ a une valeur moyenne de l'ordre de 0.25 meV, et semble peu varier avec Q et avec la température.

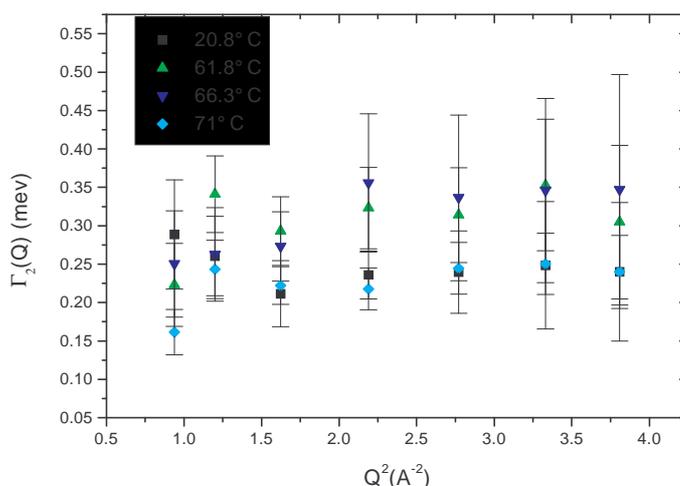


Fig 5. 13 Variation de la demi-largeur à mi-hauteur de la lorentzienne représentant les mouvements internes, en fonction de la température.

Toutefois, les erreurs expérimentales sur cette grandeur sont malheureusement trop grandes pour pouvoir discuter correctement de son comportement. Nous avons vu que, dans le cadre du modèle de diffusion confinée à l'intérieur d'une sphère, $\Gamma_2(Q)$ devrait présenter une augmentation avec Q dans la région des grandes valeurs de Q . Un tel comportement n'est pas clairement observé. Ceci peut avoir deux causes. La première est la trop grande incertitude sur les valeurs obtenues pour $\Gamma_2(Q)$. La seconde est liée au fait que, pour les plus grandes valeurs de Q , la largeur $\Gamma_2(Q)$ de la lorentzienne "large" $L_2(Q, \omega)$ n'est pas beaucoup plus grande que la largeur $\Gamma_1(Q)$ de la lorentzienne "étroite" $L_1(Q, \omega)$: le rapport entre les deux largeurs est de 2 à 4 suivant la température. Il s'ensuit que l'ajustement à l'expression 5.14, qui doit théoriquement découpler les deux types de mouvements, ne se fait peut-être pas parfaitement.

5.3.4. Facteur de Debye-Waller

A partir de la relation (5.14), nous avons calculé le facteur de Debye Waller, qui nous donne des informations sur la dynamique vibrationnelle pure de la protéine. La figure 5.14 représente, pour chaque température étudiée, le logarithme de la somme des amplitudes des lorentziennes L_1 et $L_2 \otimes L_1$, en fonction de Q^2 . D'après l'équation 5.14, cette quantité est égale à $-\langle u^2 \rangle Q^2 / 3$, à condition, comme nous l'avons déjà mentionné, de négliger la contribution au signal due à la diffusion cohérente.

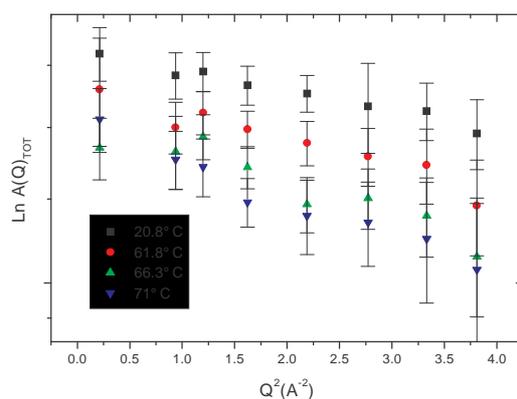


Fig 5. 14 Détermination du facteur de Debye-Waller de la néocarzinostatine en fonction de la température.

Les données montrent une dépendance linéaire en fonction de Q^2 , ce qui laisse supposer que l'approximation ci-dessus est valable. La pente des droites nous permet d'obtenir $\langle u^2 \rangle / 3$. Les valeurs obtenues pour $\langle u^2 \rangle$ varient entre $0.12 \pm 0.03 \text{ \AA}^2$ à la température de 20.8°C , jusqu'à $0.22 \pm 0.03 \text{ \AA}^2$ à la température de demi-transition 71°C .

La figure 5.15 donne la variation de $\langle u^2 \rangle$ avec la température. On observe un changement brusque de la valeur de $\langle u^2 \rangle$ à 66.3°C .

Comme nous discuterons dans la prochaine section, cette variation peut être due à un changement du potentiel harmonique de la protéine quand elle se commence à se dénaturer

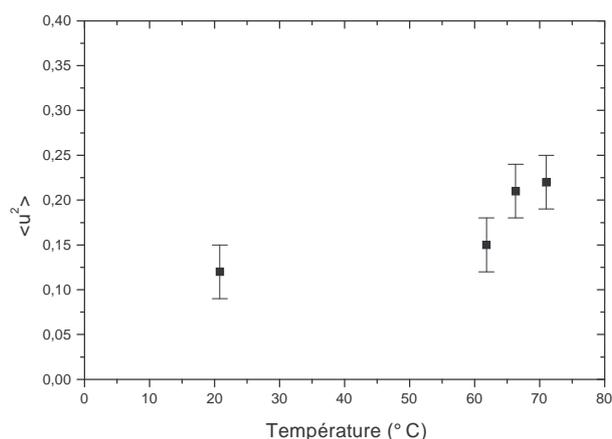


Fig 5.15 Variation du déplacement quadratique moyen de vibration $\langle u^2 \rangle$ au cours de la dénaturation de la néocarzinostatine.

5.4 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats que nous avons obtenus indiquent des *changements très nets de la dynamique interne de la protéine dans le domaine de la dizaine de picosecondes, lorsque sa conformation commence à se modifier sous l'effet d'une augmentation de température.* Tous les paramètres qui décrivent cette dynamique, tels que l'amplitude des mouvements de diffusion, la fraction de protons "immobiles", ou l'amplitude moyenne de vibration, présentent un changement brusque quand la température dépasse 65°C. Ce changement est observé quel que soit le type de modèle utilisé dans l'analyse des données, qu'il s'agisse du modèle de diffusion uniforme dans une sphère, ou du modèle de sauts sur trois sites. Nous allons maintenant reprendre dans la discussion les résultats décrits dans chacun des paragraphes précédents.

Diffusion Brownienne

Le premier point à discuter est la largeur de la lorentzienne étroite qui décrit les mouvements de diffusion globale de la protéine. Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe 5.3.1, les valeurs de la demi-largeur à mi-hauteur $\Gamma_1(Q)$ de cette lorentzienne (Figure 5.3) sont en général plus petites que la demi-largeur à mi-hauteur de la résolution expérimentale utilisée pendant l'expérience (0.048 meV). En d'autres termes, le temps

caractéristique des mouvements de diffusion brownienne varie, en fonction de la valeur de Q , entre 60 et 20 ps, à la température de 20°C, et entre 26 et 7 ps à $T=66.8^\circ\text{C}$, tandis que le temps de corrélation correspondant à la résolution est de 14 ps, et donc en général plus faible.

A première vue ce résultat paraît surprenant, puisqu'il est communément admis que, pour une résolution expérimentale donnée, seuls sont détectables les mouvements plus rapides que la résolution, et que les mouvements plus lents donnent seulement une contribution au pic élastique et ne peuvent pas être analysés. En fait, *ceci est vrai uniquement dans les cas où il existe un pic élastique, et où les mouvements que l'on cherche à analyser donnent une contribution quasi-élastique qui se superpose au pic élastique*. Si cette contribution est de largeur inférieure à celle du pic élastique, elle devient impossible à détecter. Mais cette situation n'est pas la nôtre. Dans le cas des résolutions de protéines, *il n'y a pas à proprement parler de pic élastique*, car il n'y a pas des mouvements globaux confinés de la protéine. Les spectres présentent alors un pic centré en $\omega=0$, qui n'est pas un pic élastique puisqu'il est plus large de la résolution. La demi-largeur $\Gamma_1(Q)$ correspond à cet *élargissement par rapport à la résolution*. On comprend alors aisément que l'on puisse mesurer des demi-largeurs $\Gamma_1(Q)$ plus faibles que la demi-largeur de la résolution expérimentale.

Diffusion interne

L'analyse que nous avons menée nous a conduit en particulier à l'obtention du paramètre p , défini comme la proportion d'hydrogènes "immobiles". Pour mieux comprendre la signification des valeurs de ce paramètre, nous avons déterminé, à partir du fichier PDB, comment les hydrogènes non échangés se distribuent sur la protéine.

La NCS a 113 acides aminés, pour un total de 1510 atomes, partagés entre 778 atomes de C, N, O, et 732 atomes d'hydrogène appartenant soit aux chaînes latérales soit au squelette. Parmi ces 732 atomes d'hydrogène, seulement 172 sont échangeables; ce sont ceux liés à un atome d'azote ou d'oxygène. Pour la protéine complètement dénaturée, on peut considérer un échange à 100% de ces hydrogènes échangeables. Par contre, dans la protéine compacte, de type natif, certains protons échangeables sont enfouis dans la structure et ne peuvent pas être échangés. Nous supposons que 90 % seulement des hydrogènes échangeables sont effectivement échangés, ce qui est assez général dans toutes les protéines. De plus, nous faisons l'hypothèse qu'ils sont uniformément distribués sur la protéine. Finalement, le nombre d'hydrogènes non échangés dans la NCS native, qui sont à l'origine du signal incohérent que nous mesurons, est approximativement de 577, dont la répartition est la suivante : 24 % des

hydrogènes non échangés sont distribués sur le *squelette* de la protéine, environ 39 % appartiennent aux chaînes latérales des résidus impliqués dans des *feuillet*s β , et les 37 % restants sont distribués sur les chaînes latérales des résidus situés dans des *régions non structurées* de la protéine. Pour faire ce calcul, nous avons utilisé les données de la PDB, qui font état de 7 feuillets β principaux constituant le "tonneau", et de trois autres feuillets situés en dehors de celui-ci. Il est bien évident que ce calcul est approximatif et que les pourcentages obtenus sont des ordres de grandeur, puisque la détermination de l' extension des feuillets, en particulier ceux qui ne sont pas dans le tonneau, présente une certaine ambiguïté.

Pour la protéine native à la température de 20.8°C, l' analyse de nos résultats a conduit à une proportion (1-p) d' hydrogènes "mobiles" de l' ordre de 33 % pour le modèle de diffusion dans une sphère, et de l' ordre de 42 % pour le modèle de sauts sur trois sites. Nous sommes très tentés de rapprocher ces valeurs de celle (37 %) calculée pour le nombre d' hydrogènes non échangés appartenant aux chaînes latérales des résidus des régions non structurées. Nous formulons alors l' hypothèse que seules les chaînes latérales des acides aminés qui constituent les boucles et qui sont les plus exposées au solvant adoptent des mouvements de type diffusif détectables à l' échelle de la picoseconde. Les hydrogènes qui appartiennent au squelette, ainsi que ceux des chaînes latérales impliquées dans les feuillets β sont plus contraints, et leur dynamique n' est pas visible à cette échelle.

A la température de 60.8 °C, à laquelle la protéine est encore native, nous obtenons, quel que soit le modèle utilisé, une proportion d' hydrogènes "mobiles" sensiblement plus grande qu' à température ambiante. Par contre, l' amplitude moyenne du déplacement des atomes d' hydrogène est plus faible à 60.8 °C qu' à 20.8 °C. Ceci suggère qu' à 60.8 °C, certains protons appartenant soit au squelette, soit aux chaînes latérales des résidus des feuillets β , se sont mis en mouvements, à l' échelle de la picoseconde. Toutefois, puisque la protéine a conservé sa structure, ces protons explorent des domaines spatiaux peu étendus, et leurs mouvements sont beaucoup plus restreints que ceux des hydrogène des chaînes latérales exposées au solvant. Ceci a pour conséquence qu' en moyenne sur tous les hydrogène, l' amplitude de déplacement est plus faible.

A la température de demi-transition, presque tous les hydrogènes semblent être "mobiles", avec une amplitude moyenne de mouvement encore plus faible que celle observée à température ambiante. Ce comportement pourrait être dû au fait que, à cette température, tous les protons ont une dynamique détectable à l' échelle de la picoseconde, mais que certains

mouvements, en particulier ceux du squelette et ceux des résidus impliqués dans des structures résiduelles, sont encore restreints.

Les interprétations ci-dessus, en particulier celles qui concernent le comportement de la protéine avant la transition de dénaturation, sont corroborées par les résultats des expériences de RMN du ^{13}C effectuées par l'équipe de J. Mispelter et E. Adjadj. Deux séries d'expériences ont été conduites : l'une en abondance naturelle, à 35 °C, et pour une concentration en protéine de 80 à 100 mg/ml (J. Mispelter et al., 1995) ; l'autre avec enrichissement isotopique, à température ambiante et à 50 °C, pour une concentration en protéine dix fois plus faible (E. Adjadj, communication privée). Dans les deux cas, les résonances de 79 C^α et de 11 C^β des thréonines ont été analysées. Les deux séries d'expériences conduisent à des résultats globalement cohérents, que l'on peut schématiser de la façon suivante :

- A température ambiante ou proche de l'ambiante *le squelette de la NCS est rigide*. La dynamique des C^α est caractérisée par des mouvements rapides, correspondant à des librations de faible amplitude, avec des temps caractéristiques inférieurs à quelques picosecondes. Seuls les C^α des résidus N et C terminaux sont plus mobiles, et leurs mouvements font intervenir une composante plus lente, dans le domaine de la centaine de picoseconde. Il en est de même pour 8 des 11 C^β dont les résonances ont été analysées. Ceci indique que les liaisons $\text{C}^\beta\text{-H}$ ont des mouvements en général moins restreints que les liaisons $\text{C}^\alpha\text{-H}$.

- Si l'on compare maintenant les mouvements des C^α appartenant aux feuillets β à ceux des C^α appartenant aux boucles, on constate que les premiers sont globalement plus contraints et moins mobiles que les seconds. Les groupements méthyles des C^β suivent le même type de comportement : leurs mouvements sont plus lents dans les poches hydrophobes, situées à l'intérieur du "tonneau" β , que dans les chaînes latérales exposées au solvant.

- Les expériences effectuées à 50°C sont encore en cours d'analyse, mais certains résultats peuvent d'ores et déjà être énoncés : plusieurs C^α deviennent mobiles quand on augmente la température, indiquant une flexibilité accrue du squelette. De plus, les résidus appartenant au "tonneau" β sont moins contraints qu'à température ambiante.

En résumé, l' image dynamique de la NCS à température ambiante, que l' on peut obtenir à partir des résultats de neutrons associés à ceux de RMN, est celle d' une structure rigide, où les seuls mouvements détectables à l' échelle de la picoseconde sont des mouvements de type diffusif des chaînes latérales des résidus appartenant aux boucles, qui sont les plus exposées au solvant. Le squelette de la NCS est peu flexible, avec seulement des mouvements de faible amplitude de type vibrationnel, et les 7 brins du "tonneau" β sont dans l' ensemble rigides et contraints. L' augmentation de la température a pour effet de mettre en mouvement un certain nombre d' atomes d' hydrogène, soit du squelette, soit des chaînes latérales des résidus appartenant aux feuillets β . Leurs déplacements sont toutefois plus restreints que pour les chaînes latérales exposées, tout au moins tant que la température reste inférieure à celle du point de demi-transition.

Debye Waller

La variation en fonction de la température de l' amplitude quadratique moyenne de vibration $\langle u^2 \rangle$, déduite du facteur de Debye-Waller, est caractérisée par un changement brutal à la température de 66°C. Avant de discuter des valeurs adoptées par cette quantité, ainsi que de son comportement à la transition de dénaturation, il est nécessaire de préciser sa signification. Dans notre analyse, $\langle u^2 \rangle$ prend en compte tous les mouvements d' énergie supérieure à 1 meV (qui, tout au moins dans la protéine native, sont des mouvements de type vibrationnels) produisant une diminution en $\exp(-Q^2 \langle u^2 \rangle / 3)$ du facteur de structure dynamique incohérent dans la région quasi-élastique, $S_{q,e,inc}(Q,\omega)$. Il faut immédiatement souligner que, dans la plupart des travaux de diffusion quasi-élastique des neutrons sur des protéines natives que l' on peut trouver dans la littérature (Doster, 1989, Réat 1997, 1998, Andreani, 1995), $\langle u^2 \rangle$ a une signification différente : il prend en compte à la fois les mouvements vibrationnels et les mouvements de type diffusif, et il est obtenu à partir d' un facteur de Debye-Waller qui représente la diminution de $S_{q,e,inc}(Q,\omega=0)$. Dans notre analyse, nous séparons les mouvements de vibration et les mouvements diffusifs, ce qui nous permet d' obtenir un $\langle u^2 \rangle$ purement vibrationnel. On peut réconcilier notre $\langle u^2 \rangle_{vibr}$ avec le $\langle u^2 \rangle_{total}$ des travaux ci-dessus, en observant qu' à basse température, en-dessous de la transition dynamique, $\langle u^2 \rangle_{total}$ présente une augmentation linéaire avec la température, caractéristique d' un comportement harmonique. Notre $\langle u^2 \rangle_{vibr}$ doit être comparable avec l' extrapolation linéaire du $\langle u^2 \rangle_{total}$ mesuré à basse température. Une telle extrapolation, jusqu' à la température ambiante, conduit à une valeur de l' ordre de 0.12 Å pour la myoglobine (Doster

1989), 0.10 \AA^2 pour la SOD (Andreani, 1995), et 0.15 \AA^2 pour la bactériorhodopsine (Ferrand, 1993). Ces valeurs sont très proches de celle (0.12 \AA^2) obtenue dans le présent travail pour la NCS à 20.8°C . On pourrait bien sûr objecter que les trois études citées ci-dessus concernent des poudres hydratées, alors que nous avons travaillé en solution. Une telle objection est à rejeter, puisque Pérez et al. ont constaté que la valeur de $\langle u^2 \rangle_{\text{vibr}}$ ne dépend pas du taux d'hydratation, depuis la poudre jusqu'à la solution.

Discutons maintenant du comportement en température de $\langle u^2 \rangle$ dans la NCS. Les valeurs mesurées à 20.8°C et 61.8°C sont respectivement de $0.12 \pm 0.01 \text{ \AA}^2$ et de $0.15 \pm 0.02 \text{ \AA}^2$. La valeur à 61.8°C peut donc encore être compatible avec un comportement harmonique, linéaire en température. Pour les deux températures supérieures, 66.8°C et 71°C , les valeurs de $\langle u^2 \rangle$ sont respectivement de $0.21 \pm 0.03 \text{ \AA}^2$ et de $0.22 \pm 0.03 \text{ \AA}^2$. En l'absence d'autres mesures à des températures encore plus élevées, il est difficile de donner une explication unique pour le comportement de $\langle u^2 \rangle$. On peut tout d'abord imaginer que $\langle u^2 \rangle$ dans la protéine dénaturée adopte encore un comportement harmonique, mais que, en raison de la déstructuration de la protéine, les potentiels de liaison sont plus "mous" que dans la protéine native. En d'autres termes, les constantes de force sont plus faibles, ce qui conduit à des valeurs de $\langle u^2 \rangle$ plus grandes. La deuxième explication que l'on peut évoquer est la suivante : certains mouvements, de type vibrationnel dans la protéine native, et correspondant à des énergies proches de la valeur limite 1 meV de notre zone de fit, deviennent anharmoniques quand la protéine se déplie. Ces mouvements devenus non vibrationnels, et ne relevant plus de processus harmoniques, peuvent alors intervenir dans la région en énergie $E > 1 \text{ meV}$, et contribuer ainsi au facteur Debye-Waller $\exp(-Q^2 \langle u^2 \rangle / 3)$ que nous utilisons pour extraire $\langle u^2 \rangle$. Il est très probable que les deux processus ci-dessus (constantes de force plus faibles et anharmonicité de certains mouvements) sont conjointement responsables du comportement observé pour $\langle u^2 \rangle$.

La NCS et les autres protéines

Le même type d'analyse du facteur de structure dynamique incohérent a été conduit sur d'autres protéines natives en solution, la myoglobine et le lysozyme. Les résultats sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus ici sur la NCS. Les valeurs obtenues pour les différents paramètres introduits dans l'analyse $\bar{\rho}$, $\Gamma_2(Q)$ et $\langle u^2 \rangle$ sont du même ordre de grandeur pour les trois protéines. Il est difficile de faire une comparaison précise en ce qui concerne les

valeurs de $\Gamma_2(Q)$, puisque, comme nous l' avons déjà mentionné, la détermination de $\Gamma_2(Q)$ dans le cas de la NCS est imprécise en raison de la statistique insuffisante des données. Par contre, les valeurs du rayon moyen \bar{a} de la sphère de diffusion peuvent être comparées. Pérez et al. rapportent que $\bar{a} \approx 4.4$ et 4.15 pour le lysozyme et la myoglobine respectivement. Nous trouvons une valeur légèrement inférieure pour la NCS : $\bar{a} \approx 3.05$. Ces différences pourraient être un indice de la diminution de flexibilité quand on passe du lysozyme (protéine à deux domaines mobiles l' un par rapport à l' autre) à la myoglobine (protéine à un seul domaine constituée uniquement d' hélices α), puis à la NCS (protéine possédant un "tonneau" β rigide).

En ce qui concerne le changement de dynamique lors de la dénaturation, la seule protéine à laquelle on puisse comparer la NCS est la phosphoglycérate kinase (PGK), qui a été étudiée sur le même appareil de diffusion de neutrons, dans l' état natif et dans l' état complètement dénaturé par 1.5 M de chlorure de guanidinium. Qualitativement, les résultats sont analogues : on observe dans la PGK une augmentation du nombre d' hydrogènes subissant des mouvements de type diffusif. Malheureusement, nous ne pouvons pas faire une comparaison quantitative, ceci pour deux raisons : la première est que la dynamique dans la NCS n' a été étudiée que jusqu' au point de transition, alors qu' elle a été étudiée seulement pour l' état complètement dénaturé dans le cas de la PGK. La seconde raison est que l' analyse des données obtenues pour la PGK est incomplète, et ne comporte pas de déconvolution entre mouvements browniens d' ensemble et mouvements internes.

Il est clair que cette étude de la dynamique de la NCS par diffusion quasi-élastique incohérente des neutrons nécessite de nombreuses extensions. La première concerne la dynamique dans l' état complètement dénaturé, qui n' a pas encore été abordée. Comme nous l' avons mentionné dans la section 5.2.3, la complexité du traitement dans cet état nécessite des données d' excellente qualité, et par conséquent impose que les expériences soient réalisées à l' ILL. Il faut également préciser la nature de l' augmentation de flexibilité de la NCS quand on augmente la température dans la région précédant la transition de dénaturation ($20^\circ\text{C} < T < 60^\circ\text{C}$). Trois types d' expériences doivent être effectuées (certaines sont en cours): neutrons, RMN et simulation de dynamique moléculaire. C' est la confrontation des trois analyses qui permettra de déterminer les régions de la protéine où les contraintes se relâchent, et la géométrie des mouvements mis en jeu, ainsi que leurs temps de relaxation caractéristiques.

Enfin, une étude analogue est prévue sur le mutant de la NCS dans lequel on a supprimé le pont disulfure 37-47, afin de comprendre l' influence de ce pont sur la flexibilité de la protéine.